

ĐẶC TRUNG CỦA VÙNG MÃ ITS-rDNA CỦA 2 LOÀI TUYẾN TRÙNG KÝ SINH THỰC VẬT MỚI THUỘC GIỐNG *RADOPHOLUS* THORNE 1949 Ở VIỆT NAM

NGUYỄN NGỌC CHÂU, TRINH QUANG PHÁP
Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

MAURICE MOENS
*Trung tâm nghiên cứu nông nghiệp Merelbek,
Vương quốc Bỉ*

Do có nhiều ưu thế vượt trội như nhanh, nhạy, chính xác, các kỹ thuật DNA ngày càng được ứng dụng rộng rãi để phân loại và nghiên cứu phả hệ (phylogeny) của nhiều nhóm sinh vật khác nhau từ vi sinh vật đến động, thực vật bậc cao. Kỹ thuật DNA đặc biệt có lợi trong việc phân loại các nhóm sinh vật đồng hình (isomorphic) hoặc dị hình (heteromorphic). Những nhóm này thường gặp nhiều rắc rối và dường như không đảm bảo độ tin cậy cao khi phân loại bằng phương pháp hình thái truyền thống.

Tuyến trùng là một trong số ít đối tượng động vật không xương sống ở Việt Nam đã được áp dụng kỹ thuật phân tử DNA để trợ giúp phân loại hình thái. Trong đa số trường hợp, đặc trưng phân tử giúp khẳng định các kết quả của phân loại hình thái. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, đặc trưng phân tử được coi là chỉ tiêu phân loại mang tính quyết định. Trong số này, có 2

loài tuyến trùng mới cho khoa học được phát hiện là ký sinh quan trọng ở cây trồng vùng Tây Nguyên là *Radopholus duriophilus* Nguyen et al. 2003 [5] và *R. arabocoffeae* Trinh et al. 2004 [9]. Đại diện của hai loài tuyến trùng này rất khó phân biệt về hình thái. Vì vậy, việc xác định đặc trưng DNA trở thành công cụ quan trọng để phân loại hai loài tuyến trùng này. Vùng phiên mã ITS-rDNA của ribosom chứa các cấu trúc di truyền đặc thù không biến đổi nên rất có giá trị để phân loại loài và dưới loài. Bài này so sánh đặc trưng phân tử của vùng ITS-rDNA của 2 loài tuyến trùng ký sinh thực vật quan trọng này.

I - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu vật tuyến trùng

Bao gồm 4 quần thể tuyến trùng thuộc 2 loài *Radopholus duriophilus* và *R. arabocoffeae* được thu thập tại tỉnh Đắk Lắk (bảng 1).

Bảng 1

Các quần thể *Radopholus*

Số mẫu	Tên loài	Cây chủ	Địa điểm
RD-1824	<i>R. duriophilus</i>	Sầu riêng (<i>Durio zibetinus</i>)	Buôn Ma Thuột
RD-1865	<i>R. duriophilus</i>	Sầu riêng	Krông Năng
RD-1868	<i>R. duriophilus</i>	Cà phê vối (<i>Coffea canephora</i>)	Krông Năng
RA-2059	<i>R. arabocoffeae</i>	Cà phê chè (<i>Coffea arabica</i>)	Krông Ana

DNA được tách chiết và khuếch đại bằng PCR theo công bố của Nguyễn Ngọc Châu [5] và Waeyenberge [11]. Cặp mồi là những đoạn

gồm 18S và 26S của *Caenorhabditis elegans* gồm: rDNA1 (5'-CGTAACAAGGTAGCTGT-AG-3') và rDNA2 (5'-TCCTCCGCTAAATGA-

TATG-3'). Sản phẩm PCR được nhân dòng (cloning) bằng vectơ pGEM-T trong chủng *E.coli* JM109 theo quy trình của Promega [6]. Sản phẩm DNA cuối cùng được làm sạch bằng Centriflex Gel Filtration Cartridge [6]. Trình tự DNA được đọc trên máy ABI Prism 310 Genetic Analyser.

Trình tự ITS-rDNA của các quần thể tuyến trùng được sắp xếp bởi Clustal 1.64 (mặc định sẵn) cùng với các trình tự ITS-rDNA của 13 quần thể khác của loài *Radopholus similis* Thorne 1949 từ GenBank. Phân tích sự tương đồng tối ưu (maximum parsimony-MP) với giá trị bootstrap được mặc định là 1000. Đánh giá sự sai khác vị trí của nucleotit giữa các quần thể được xử lý bởi thuật tối ưu (maximum likelihood algorithms) với sự giúp đỡ của phần

mềm PAUP* 4.0 (Swofford, 1998).

Trình tự ITS-rDNA của 2 loài tuyến trùng mới từ Việt Nam đã được công bố và nộp Ngân hàng Gen (GenBank) với số hiệu sau: AY257199, AY257200, AY547297.

II - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đặc trưng hình thái của 2 loài tuyến trùng mới

Kết quả quan sát cấu trúc hình thái và phân tích lượng hình (morphometrics) cho thấy 2 loài tuyến trùng này có sự tương đồng hình thái và những khác biệt không lớn, tuy nhiên, có sự khác biệt về kiểu sinh sản giữa 2 loài này (bảng 2). Với những khác biệt hình thái trên đây, rất khó để phân biệt chúng là 2 loài khác nhau.

Bảng 2

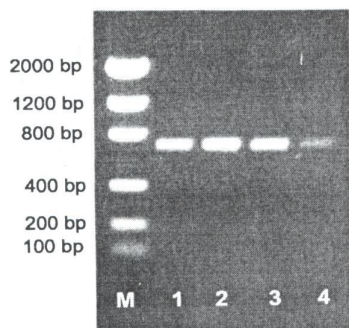
So sánh khác biệt hình thái của 2 loài *Radopholus* của Việt Nam

Các đặc trưng hình thái, sinh học	<i>R. duriophilus</i>	<i>R. arabocoffeae</i>
Lỗ amphit	Không có bờ viền	Có bờ cao xung quanh
Chiều dài của kim hút con đực	11,5-15 µm	8,2-11,6 µm
Chiều dài của hyalin đuôi	4-9,5 µm	2,6-3,4 µm
Khoảng cách DO đến gốc kim hút	4-9,5 µm	1,7-3,4 µm
Hình dạng của tinh trùng	Dạng thận	Dạng que
Kiểu sinh sản	Lưỡng tính	Hữu tính

2. Đặc trưng phân tử của vùng mã ITS-rDNA

Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR (ITS-rDNA) của 3 quần thể tuyến trùng RD-1824, RD-1865 và RD-1868 thuộc loài *R. duriophilus* có kích thước bằng 708 bp, trong

khi đó sản phẩm PCR thu được từ quần thể RA-2059 thuộc loài *R. arabocoffeae* ít hơn (hình 1). Tuy nhiên, sản phẩm PCR của 4 quần thể *Radopholus* sau nhân đơn dòng có kích thước khá đều nhau bằng 896 bp (hình 2).



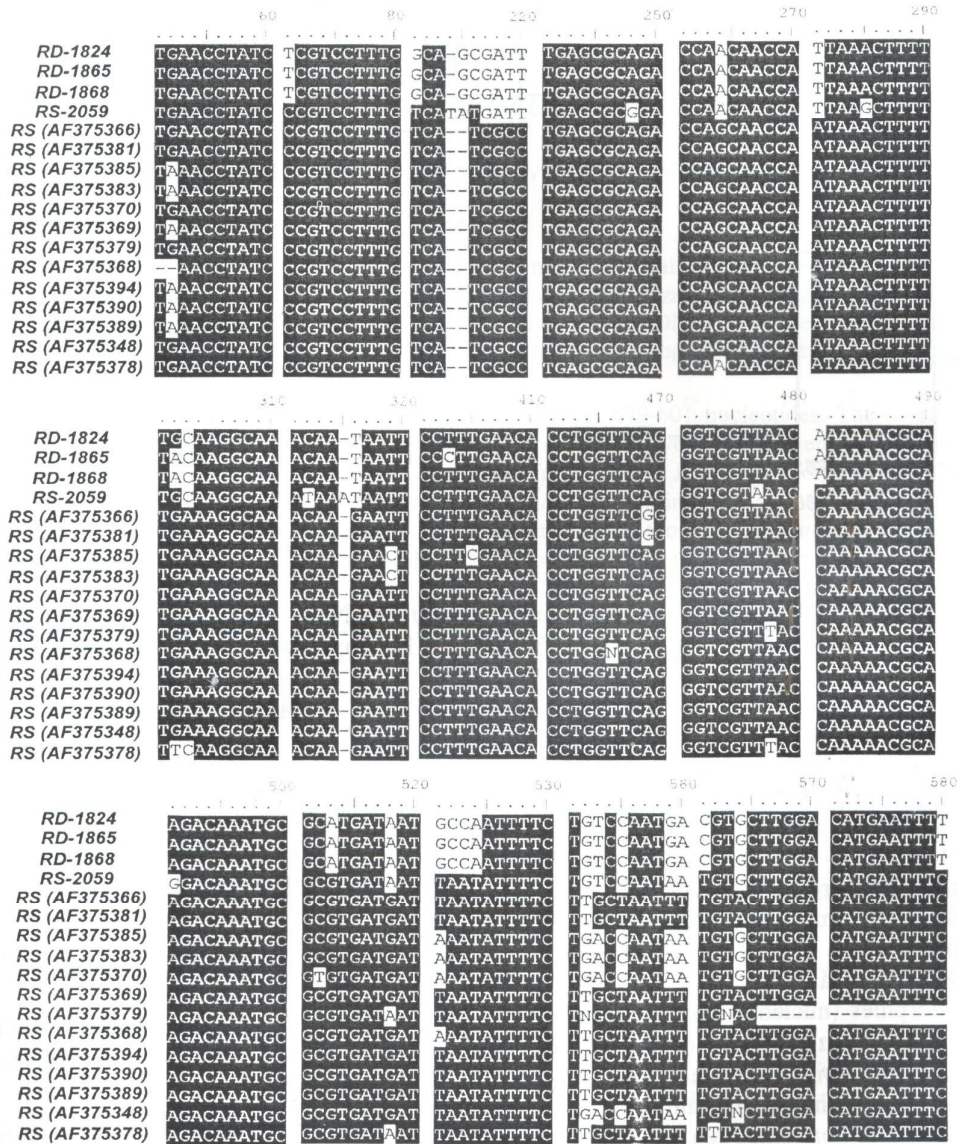
Hình 1. Sản phẩm PCR sạch
M: thang chuẩn; 1: RD-1824; 2: RD-1865;
3: RD-1868; 4: RA-2059



Hình 2. Sản phẩm PCR sau nhân đơn dòng:
M: thang chuẩn; 1-2: RD-1824; 3-4: RD-1865;
4-6: RD-1868; 7-8: RA-2059

Vùng ITS được giải trình tự của các quần thể tuyến trùng *Radopholus* spp. gồm một phần đoạn gen 18S, vùng phiên mã 1, đoạn gen 5,8S, vùng phiên mã 2 và một phần đoạn gen 28S. Sự sai khác trình tự của vùng ITS của 4 quần thể tuyến trùng được được căn chỉnh và so sánh với 13 quần thể khác của loài tuyến trùng gần nhất là *R. similis* Thorne 1949 và được trình

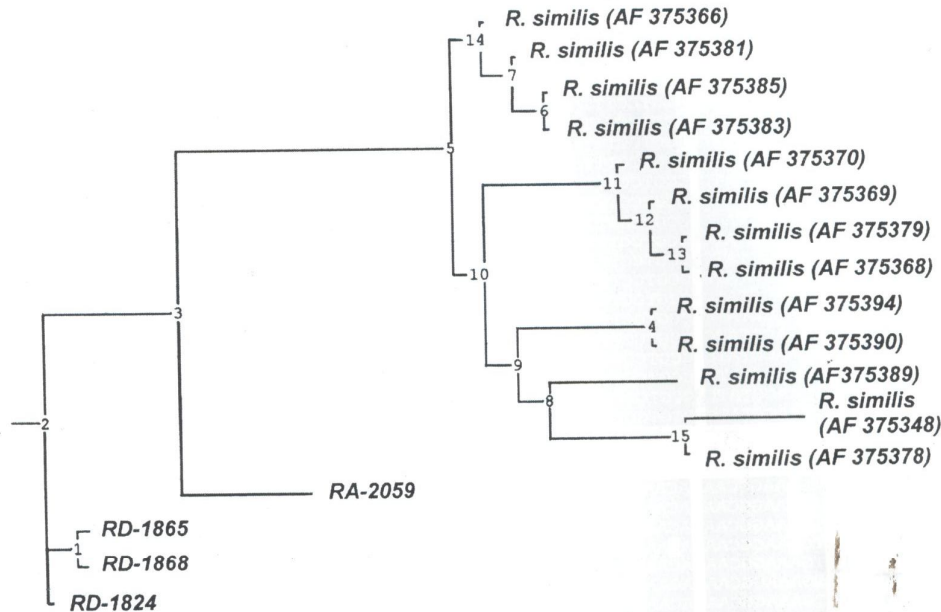
bày tóm tắt ở hình 3. Kích thước phân tử của vùng ITS-rDNA của các quần thể tuyến trùng *Radopholus* spp. là 599-601 nucleotit và chúng được sắp xếp thành 602-604 vị trí. Sự sai khác trình tự giữa các quần thể của *Radopholus* là từ 0,2 đến 6,3%, trong đó sự sai khác trình tự này giữa các quần thể của loài *R. similis* là 2-23 vị trí thay thế.



Hình 3. Trình tự nucleotit của 4 quần thể *Radopholus* thuộc 2 loài mới so với các quần thể của loài *Radopholus similis* trên thế giới. Những lỗ hổng được xử lý như là thiếu số liệu

Sự sai khác chuỗi trình tự ITS-rDNA của các quần thể *R. duriophilus* (RD-1824, RD-1865 và RD-1868) so với *R. similis* là 28 đến 37 vị trí thay thế, tương đương 4,7-6,2 %. Trong khi sự sai khác trình tự này của *R. arabocoffeae* (RA-2059) so với với các quần thể của *R. duriophilus*

và các quần thể *Radopholus* khác từ 21-31 vị trí thay thế (3,5-5,2%). Phân tích maximum parsimony đã phát hiện 35 đặc trưng thông tin (parsimony informative characters) ở *R. duriophilus* và 37 đặc trưng thông tin ở *R. arabocoffeae*.



Hình 4. Quan hệ phát sinh của 4 chủng tuyến trùng ở Việt Nam cho thấy chúng thuộc 2 loài mới tách biệt với các quần thể khác của loài tuyến trùng *R. similis*

Quan hệ phát sinh của 4 quần thể *Radopholus* của Việt Nam đã được nhóm chung với 13 quần thể khác của loài *R. similis* và tạo được mô hình unrooted maximum parsimonious (hình 4) với 3 nhánh phát sinh rõ ràng: ngoài nhánh tập hợp 13 quần thể đại diện cho loài *R. similis*, 2 nhánh riêng biệt đại diện cho 2 loài mới của Việt Nam. Đó là nhánh *R. duriophilus* với tập hợp của 3 quần thể RD-1824, RD-1865 và RD-1868. Nhánh này được ủng hộ bởi 24 autapomorphies (nucleotit thay thế), còn nhình RA-2059, đại diện cho loài mới *R. arabocoffeae* được xác nhận bởi 7 autapomorphies. Như vậy, cây phả hệ này cho phép khẳng định quần thể tuyến trùng *Radopholus* trên cây cà phê với, RD-1868 hoàn toàn khác với quần thể RA-2059 trên cây cà phê chè. Chúng thuộc 2 loài khác nhau và hoàn toàn độc lập với các loài tuyến trùng *Radopholus* đã được biết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Elbadri G. A. A. et al., 2002: Inter. J. Parasitol., 32: 199-205.
2. Ferris V. R., Ferris J. M. & Faghihi J., 1993: Fund. and Appl. Nematol., 16: 177-184.
3. Kaplan D. T. et al., 2000: J. Nematology., 32: 134-142.
4. Nguyễn Ngọc Châu, 2003: Tuyến trùng thực vật và cơ sở phòng trừ. Nxb. KH&KT, Hà Nội, 302 tr.
5. Nguyen N.C. et al., 2003: Nematology, 5: 549-558.
6. Protocol and Application Guide, Third Edition, 1996: Omega Cooperation, Madison, USA, 51 pp.

7. Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis, 1989: Composition of electrophoresis buffer. In: Molecular cloning, a laboratory manual: 66-67. Forsol N. et al. (Eds). New York, USA, Cold spring Harbor Laboratory Press.
8. Swofford D. L., 1998: PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Version 4. Sunderland, MA, USA, 128 pp.
9. Trinh Q. P. et al., 2004: Nematology, 6: 681-694.
10. Vrain T. C. et al., 1992: Fund. and Appl. Nematol., 15: 563-573.
11. Waeyenberge L. et al., 2000: Nematology, 2: 135-142.

MOLECULAR CHARACTERS OF THE ITS-rDNA REGION OF TWO NEW SPECIES OF *RADOPHOLUS* IN VIETNAM

NGUYEN NGOC CHAU, TRINH QUANG PHAP, MAURICE MOENS

SUMMARY

Four populations of *Radopholus* spp. who are very close morphologically were collected from durian and coffee trees in DaLac province and examined for molecular characterization based on sequencing of the internal transcribed spacer region of the ribosomal DNA cistron (ITS-rDNA). The electrophoresis of PCR products were yielded homogeneously with a molecular length of 708 bp of amplification and 896 bp of cloning products.

The entire ITS region of *Radopholus* populations varied from 599-601 nucleotides. The length of the alignment for *Radopholus* sequences was 602 positions. The sequence divergence ranged from 0.3 to 6.2%. The sequences of *R. duriophilus* Nguyen *et al.* 2003 differed from those of *R. similis* Thorne 1949 in 28 to 37 substitutions (4.7-6.2%), whereas the sequences within *R. similis* differed in 2 to 23 substitutions (0.3-3.8%). The sequences of *R. arabocoffeae* Trinh *et al.* 2004 differed from those of *Radopholus* spp. in 21-31 substitutions (3.5-5.2%). The MP analysis revealed 35 parsimony informative characters for *R. duriophilus* and 37 ones for *R. arabocoffeae*.

The single unrooted maximum parsimonious tree is given with the distribution of *Radopholus* populations in three separated branches on the tree is congruent with the one presented by Elbadri *et al.* 2002. The branch of *R. duriophilus* was supported by 24 autapomorphies and the other branch of *R. arabocoffeae* was distributed between *R. similis* and *R. duriophilus* and it was supported by 7 autapomorphies (unique substitutions).

These two new species were confirmed the separation between the population RD-1868 isolated from *Coffea canephora* belonging to *R. duriophilus* and the population RA-2059 isolated from *Coffea arabica* belonging to *R. arabocoffeae*.

Ngày nhận bài: 8-5-2004